

THESIS

BONN

1969

**LICHTMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN
MIT AN FERRITIN GEKOPPELTEN ANTIKÖRPERN
ÜBER DAS VORKOMMEN ORGANSPEZIFISCHEN
ANTIGENS IN DER LEBER UND IM HEPATOM DER
RATTE**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von
KATHARINA BOROWSKI
Katharina Borowski
aus
BEUTHEN

BONN 1969

**LICHTMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN
MIT AN FERRITIN GEKOPPELTEN ANTIKÖRPERN
ÜBER DAS VORKOMMEN ORGANSPEZIFISCHEN
ANTIGENS IN DER LEBER UND IM HEPATOM DER
RATTE**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von
KATHARINA BOROWSKI
aus
BEUTHEN

BONN 1969

Angefertigt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Bonn

Referent: Prof.D.O.Haferkamp
Korreferent: Prof.Dr.H.Hamperl

Tag der mündlichen Prüfung: 3.4.1969

Aus dem Pathologischen Institut
der Universität Bonn

Druck: Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität
B o n n

Verzeichnis der Ausgaben

Bezeichnung	
1. Ausgaben für den Betrieb des	10
Unternehmens	
2. Ausgaben für den Betrieb des	10
Unternehmens	
3. Ausgaben für den Betrieb des	10
Unternehmens	
4. Ausgaben für den Betrieb des	10
Unternehmens	
5. Ausgaben für den Betrieb des	10
Unternehmens	
6. Ausgaben für den Betrieb des	10
Unternehmens	
7. Ausgaben für den Betrieb des	10
Unternehmens	
8. Ausgaben für den Betrieb des	10
Unternehmens	
9. Ausgaben für den Betrieb des	10
Unternehmens	
10. Ausgaben für den Betrieb des	10
Unternehmens	
11. Ausgaben für den Betrieb des	10
Unternehmens	
12. Ausgaben für den Betrieb des	10
Unternehmens	
13. Ausgaben für den Betrieb des	10
Unternehmens	
14. Ausgaben für den Betrieb des	10
Unternehmens	
15. Ausgaben für den Betrieb des	10
Unternehmens	
16. Ausgaben für den Betrieb des	10
Unternehmens	
17. Ausgaben für den Betrieb des	10
Unternehmens	
18. Ausgaben für den Betrieb des	10
Unternehmens	
19. Ausgaben für den Betrieb des	10
Unternehmens	
20. Ausgaben für den Betrieb des	10
Unternehmens	

Meiner Mutter gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsübersicht

	<u>Seite</u>
Einleitung	8
I. Gewinnung von Kaninchenserum mit leberspezifischem Antikörper gegen die Mitochondrien- und Mikrosomenfraktion der Rattenleber und immunhistologische Austestung nach der Methode von C o o n s und K a p l a n	10 ' ' ' 17
A Material und Methode	10
1. Antigengewinnung	10
2. Gewinnung der Antiseren	11
3. Absorption der Antiseren	12
a) Vorbemerkung	12
b) Technische Durchführung	12
4. Austesten der Antiseren	13
a) Erklärung der indirekten Methode nach Coons und Kaplan	13
b) Durchführung am normalen Lebergewebe der Ratte	15
c) Durchführung am Hepatomgewebe	16
B Ergebnisse	17

	Seite
II. Indirekte immunhistologische Austestung	18
der Antiseren gegen leberspezifisches	'
Antigen mittels ferritinmarkierter	'
χ -Globuline (Antikörper)	29
A Material und Methode	18
1. Konjugation von χ -Globulinen vom Schaf	20
mit Antikörpereigenschaft gegen	
Kaninchen- χ -Globuline an Ferritin	
nach Angaben von H s u	
a) Vorbemerkung	20
b) Reinigung des Ferritins, Reaktion	20
mit m-Xylylene-Diisocyanat und	
Kopplung des Ferritins an	
Schafglobuline	
2. Durchführung der indirekten immunhistolo-	28
gischen Reaktion unter Verwendung der an	
Ferritin gekoppelten χ -Globuline (Antikörper)	
3. Histochemische Eisenreaktion zum Nachweis der	28
an Ferritin gekoppelten χ -Globuline im Gewebe	
nach der indirekten immunhistologischen Methode	
a) Vorbemerkung	28
b) Technische Durchführung	29
B Ergebnisse	29

	<u>Seite</u>
III. Diskussion	30
IV. Zusammenfassung	32
V. Bilddokumentation	34
VI. Literaturverzeichnis	37

Einführung

Erst seit es H s u gelang, eine technisch einfache Methodik auszu-
zuarbeiten, um - den Erstveröffentlichungen von S i n g e r fol-
gend - den Eisen-Eiweißkomplex Ferritin an spezifische Antikörper
(γ -Globuline) zu koppeln, konnte das Elektronenmikroskop dem
Immunologen für eine submikroskopische Antigenlokalisation dienen.
Da durch den Kopplungsvorgang die Antikörperaktivität abnimmt,
stellt sich die Frage nach der verbliebenen Reaktionsfähigkeit
von Antikörpern (γ -Globulinen), die mit Ferritin markiert wor-
den waren.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine einfache und schnelle
Methode zu finden, die unter Umgehung der zeitraubenden elektro-
nenmikroskopischen Technik die Bindung ferritingekoppelter Anti-
körper an das spezifische Antigen im Gewebe nachweist. Erst bei
positivem Ausfall dieses gewissermaßen Vorversuches würden weite-
re immunelektronenmikroskopische Untersuchungen lohnend erschei-
nen.

Unsere Idee war es, ferritingekoppelte γ -Globuline (mit spezi-
fischen Antikörpereigenschaften) lichtmikroskopisch mit einer
histochemischen Eisenreaktion sichtbar zu machen, nachdem diese

sich mit ihren Antigenen im Sinne einer Antigen-Antikörperreaktion verbunden hatten. Auf der Suche nach einem Modell boten sich heterologe, leberspezifische Antiseren an (Weiler 1952, 1954, 1955, 1961, Vogel und Mitarb., 1966). Weiler fand mittels solcher Seren organspezifische Antigene in der Mitochondrien- und Mikrosomenfraktion der Rattenleber und einen Verlust dieser Antigene bei Hepatomen. Hughes und Mitarb. (1957, 1958) widersprachen Weilers Befunden; Nairn und Mitarb. (1960), Engelhardt und Mitarb. (1963) und Day (1965) bestätigten sie. Green ließ das organspezifische Leberantigen durch Injektion des Kaninchenantisera mit seinem Antikörper in vivo reagieren und wies in vitro, d.h. am Gewebsschnitt, mit fluoreszierenden Schafglobulinen gegen Kaninchen- γ -Globuline die abgelaufenen Reaktionen zwischen leberspezifischem Antigen und abhängigem Antikörper nach.

Die folgende Untersuchung gliedert sich in zwei getrennte Arbeitsgänge. Im ersten Gang wurden die Antiseren gegen die Mitochondrien- und Mikrosomenfraktion der Rattenleber bei Kaninchen gewonnen und ihre Aktivität mit der indirekten Fluoreszenzmethode nach Coons und Kaplan an normalem Lebergewebe und an Hepatome der Ratte geprüft. Der zweite Teil umfasste den Nachweis verbliebener Antikörperaktivität von γ -Globulinen nach ihrer Kopplung an Ferritin. In Anlehnung an die indirekte Methode von Coons und Kaplan reagierte bei meinen Versuchen zunächst ein ungekoppeltes, spezifisches Kaninchenantiserum mit Rattenleber-

bzw. mit Rattenhepatomgewebe und erst dann ein Schaf- γ -Globulin mit Antikörperaktivität gegen Kaninchen- γ -Globulin nach seiner Kopplung an Ferritin mit dem an das Gewebe fixierten Kaninchen- γ -Globulin. Die Fixation dieses mit Ferritin markierten Antikörpers war mittels einer histochemischen Eisenreaktion nachzuweisen.

- I. Gewinnung von Kaninchenserum mit leberspezifischem Antikörper gegen die Mitochondrien- und Mikrosomenfraktion der Rattenleber und immunhistologische Austestung der Antiseren mit der indirekten Methode nach C o o n s und K a p l a n

A. Material und Methode

1. Antigengewinnung

Da Antigene als organische Stoffe schnell durch Bakterien und Fermente abgebaut werden, erfolgte die Antigenzubereitung entweder unmittelbar vor der Injektion, oder die Mitochondrien- und Mikrosomenfraktionen wurden als Suspensionen auf -32°C eingefroren.

Unter wiederholten Injektionen von gepufferter 0,25 m Rohrzuckerlösung (pH 7,3, 1/10 Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4) in den linken Ventrikel einer mit Äther betäubten Ratte entbluteten wir das Tier. Dazu wurde die Vena cava inferior zum Abfluß von Blut und Spülflüssigkeit eröffnet. Erst wenn die Leberfarbe von rot-braun nach grau-weiß gewechselt hatte, also eine Anämie erreicht worden war, wurde die Leber herauspräpariert und mit einer Stahlschere zerkleinert.

Bei der Herstellung der Mitochondrien- und Mikrosomenfraktionen der Rattenleber wie bei der Gewinnung der Immunsereen und deren Absorption stützten wir uns weitgehend auf die Angaben von Weiler (1955). Das Ausgangsmaterial bestand jeweils aus drei Rattenlebern. Das zerstückelte Gewebe wurde mit ca. 10 Volumenteilen der o.a. Rohrzuckerlösung in einem Braun-Multimix-Gerät etwa 2 Minuten homogenisiert. Der Puffer war vor Gebrauch auf $+ 4^{\circ}\text{C}$ gekühlt worden. Der Homogenisierungsvorgang wurde bei stärkerer Erwärmung der Zerkleinerungsmesser zu deren Abkühlung unterbrochen. Überhaupt wurde darauf geachtet, die Antigenzubereitung in der Kälte und unter möglichst sterilen Bedingungen durchzuführen. Dann wurden die Zellkerne durch Zentrifugieren bei 1750 g, 7 Minuten lang, entfernt. Bei der folgenden Zentrifugation von 10 Minuten Dauer bei 9000 g fiel als Bodensatz die Mitochondrienfraktion aus. (Weiler). Die Mikrosomenfraktion sedimentierte aus dem zurückbleibenden Überstand vollständig, wenn sie in ein Schwerfeld von 33 000 g (Spinco-Ultrazentrifuge) 30 Minuten lang kam. (Weiler). Mitochondrien- und Mikrosomenfraktionen wurden in je 25 ml Rohrzuckerpuffer aufgewirbelt. Je 3 ml wurden als Suspension in Glasröhrchen auf $- 32^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Die Eiweißbestimmung mit dem Kjeldahlapparat ergab für die Mitochondrienfraktion 450 mg% und für die Mikrosomenfraktion 500 mg%.

2.

Gewinnung der Antiseren

Als Antikörperspender dienten 6 Hauskaninchen unterschiedlichen Geschlechts im Alter von $1/2$ bis 1 Jahr und einem Gewicht von 2,5 bis 5,0 kg. Sie wurden in 2 Gruppen von je drei Tieren unter-

teilt, wobei die eine mit der Mitochondrienfraktion, die andere mit der Mikrosomenfraktion sensibilisiert wurde. Im Abstand von zwei Tagen erhielten die Tiere je 1 ml i.v. gespritzt (die Mitochondriensuspension von 1 ml hatte 4,5 mg Eiweißgehalt, die Mikrosomensuspension enthielt in 1 ml 5,0 mg Eiweiß). Nach 4 Wochen hatten die Tiere eine Gesamtdosis von 70 mg Eiweiß bzw. 80 mg Eiweiß einverleibt bekommen. Etwa 40 ml Blut wurde 2 Tage nach der letzten Injektion den Tieren aus der Ohrvene entnommen, abgesert und zur Sterilisierung durch einen Milliporefilter geschickt. Für die Absorption und die fluoreszenzmikroskopische Austestung waren je 2 ml zurückbehalten worden.

3.

Absorption der Antiseren

a) Vorbemerkung: Bei einer Immunisierung gegen artfremdes Organ- gewebe entstehen zwei Typen von Antikörpern. Der eine ist organ- spezifisch und kann nur durch das zur Immunisierung verwandte Or- ganmaterial absorbiert werden; der andere Antikörper vermag auch, mit anderen Organgeweben der gleichen Spezies in Reaktion zu tre- ten. Deshalb müssen, wenn man nur an der Organspezifität interes- siert ist, aus einem solchen Antiserum zunächst die speziesspezifi- schen Antikörper - in unserem Falle etwa mit Nierengewebe - ent- fernt werden. Die Absorption wird allerdings stets auch eine Se- rumverdünnung und Verminderung der Antikörperaktivität zur Folge haben (S c h m i d t und Mitarb., 1966).

b) Technische Durchführung: Nach Homogenisierung von Rattennieren- partikeln in 0,25 M Rohrzuckerlösung (s.o.) wurden Zellfraktio-

nen und Gewebetrümmer durch 7 minütige Zentrifugation bei 1750 g entfernt. Die im Überstand bleibenden Mitochondrien und Mikrosomen sedimentierten bei der folgenden Zentrifugation in einer Spinco-Ultrazentrifuge bei einer Umdrehungszahl von 33 000 g und einer Dauer von 30 Minuten (Weiler). 2 ml Antiserum wurden im Verhältnis 1 : 1 mit dem Bodensatz aus Mitochondrien und Mikrosomen der Rattenniere vermischt und 1 Stunde in einem Wasserbad von 37° C aufbewahrt. Dann stand das Absorptionshomogenat für 24 Stunden im Kühlschrank. Das Präzipitat sowie nicht präzipitierte Nierenteilchen wurden erneut in der Spinco-Ultrazentrifuge während 1/2 Stunde bei 33 000 g abgetrennt. Der Überstand war das absorbierte Antiserum.

4.

Austesten der Antiseren

a) Erklärung der indirekten Methode nach Coons und Kaplan

Jeder Antikörper wirkt in seiner Eigenschaft als γ -Globulin-Protein in einem heterologen, von abhängigem Antigen freien Organismus seinerseits als Antigen; gemäß der Antigendefinition führt er dann zur Antikörperbildung (Schmidt 1955). An ein solches antikörperhaltiges γ -Globulin mit Antikörpern (gegen Antikörper), gewissermaßen einem Anti-Antikörper (Ak'), koppelten Coons und Kaplan den Farbstoff Fluorescein-(iso)-thiocyanat, ohne dass der gekoppelte Antikörper seine Aktivität einbüßte. Somit konnten Coons und Kaplan die Antigen-(Ag)-Antikörper-(Ak)-Bindung auf einem Gewebsschnitt sekundär sichtbar werden lassen, indem sie den Schnitt mit einem fluoreszierenden Anti-Antikörper überschichteten. Ist ein leberspezifisches Antigen nachzuweisen, wäre der

Versuchsgang in zwei Hauptabschnitte geteilt:

1. Inkubation eines Gewebsschnittes mit absorbiertem Antileberserum vom Kaninchen zur Bildung eines Ag-Ak-Komplexes,
2. Anlagerung von farbstoffmarkierten Schaf-Antikörpern (γ -Globulinen) gegen Kaninchenglobuline (Kaninchenantikörper) zur Bildung eines Ag-Ak-Ak'-Komplexes mit anschließender Prüfung, ob anhand der gelb-grünen Fluoreszenz des markierten Ak's (Anti-Antikörper) Fluoreszenz mikroskopisch nachgewiesen werden kann.

Die beschriebene Methode hat Nachteile. Leicht entsteht eine unspezifische Färbung durch Direktverbindung von Farbstoffkonjugat und Gewebe. Auch können sich unspezifische Kaninchenglobuline mit Gewebepartikeln verbinden, ohne daß eine spezifische, serologische Reaktion abgelaufen wäre. Zur Sicherung jedes Ergebnisses einer spezifischen, auf einer Antigen-Antikörper-Bindung beruhenden Fluoreszenz sind daher K o n t r o l l e n notwendig. Im sogenannten B l o c k i n g t e s t (Kontrolle I) wird vor Gebrauch der markierten γ -Globuline der Schnitt mit unmarkierten Schaf- γ -Globulinen überschichtet. Durch diesen Schritt werden für die fluoreszierenden Schaf-Antikörper die spezifischen Antigene gewissermaßen abgesättigt. Eine weitere Möglichkeit ist, den Schnitt mit normalem Kaninchenserum zu behandeln, wobei keine Bindung der γ -Globuline auftreten soll. (Kontrolle II). Fehlt den Kontrollschnitten gegenüber den Versuchsschnitten die gelb-grüne Fluoreszenz, ist eine Aussage über eine spezifische Antigen-Antikörper-Bindung erlaubt. Dabei muß die Fluoreszenz auf das Organ beschränkt sein, gegen welches die Antiseren gerichtet sind. Zum

Ausschluß kreuzreagierender Antikörper und Prüfung einer erfolgreichen Absorption wird das Gewebe, dessen Homogenat nicht zur Gewinnung der spezifischen Antiseren diente, mit den spezifischen Antiseren ausgetestet. Wir verwandten bei dieser Kontrolle (Kontrolle III - Absorptionskontrolle) Nierengewebe.

b) Durchführung an normalem Lebergewebe der Ratte:

Unmittelbar nach der Tötung einer Ratte wurde die Leber entnommen, in 3 - 5 mm² große Stücke geschnitten und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Ohne vorheriges Auftauen wurde das Gewebebröckchen auf dem Tisch eines Gefriermikrotoms festgeeist, dessen Schnittdicke auf 5 μ eingestellt worden war. Danach wurde wie folgt vorgegangen:

1. Unfixierte Schnitte in reichlicher 0,8%iger NaCl-Lösung (pH 7,2, 0,01 m Na₂HPO₄ - NaH₂PO₄) wässern.
2. Schnitte herausnehmen, unter Schonung der Schnitte Objektträger auf einem Tuch trocken wischen, Schnitte mit absorbiertem Antiserum überschichten, für 30 Min. in eine feuchte Kammer stellen (1. Inkubation).
3. Schnitte gründlich in gepufferter NaCl-Lösung (s.o.) zur Entfernung überschüssigen Antiserums spülen, etwa 15 Min., Spülflüssigkeit 2 - 3 mal erneuern.
4. Überschichten mit markiertem Schaf- γ -Globulin; zur Inkubation werden Schnitt und Antiserum in die feuchte Kammer gestellt. (2. Inkubation). (Sowohl die Sensibilisierung von Tieren gegen Kaninchenglobuline - es wurden Schafe immunisiert - als auch die Kopplung der Schafglobuline wurde in dem hiesigen Labor nach der Vorschrift von

R i g g s und Mitarb. mit Fluorescein-(iso)-thiocyanat als Farbstoff durchgeführt.)

5. Auswaschen von ungebundenem, markiertem Antiserum (wie bei 3).
6. Eindecken der Schnitte in einem Gemisch von 1 Teil reinstem Glycerin und 9 Teilen der o.a. NaCl-Lösung.
7. Mikroskopieren der Präparate im Fluoreszenzmikroskop.

Um die Fluoreszenzintensität vor und nach der Absorption vergleichen zu können, hatten wir Leberschnitte sowohl mit unabsorbiertem Antiserum als auch mit absorbiertem überschichtet. Die praktische Durchführung der Kontrollen (Kontrolle I = Blockingtest, Kontrolle II = Inkubation mit normalem Kaninchenserum, Kontrolle III = Absorptionskontrolle) deckte sich mit den Angaben zur Austestung von spezifischen Antisera. Kontrolle III erfolgte unmittelbar nach Absorption der Antisera.

c) Durchführung am Hepatomgewebe: Um Hepatomgewebe der Ratte auf seinen Verlust an spezifischen Antigenen (Weiler) zu untersuchen, töteten wir mit Äther eine Ratte, bei der chemisch mit Diäthylnitrosamin ein Hepatom im hiesigen Tierstall induziert worden war, welches auch histologisch bestätigt werden konnte. Ein kleines Gewebstückchen, das schon makroskopisch eine Unterscheidung zwischen krebsigem und gesundem Lebergewebe gestattete, wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nachdem mit dem Gefriermikrotom von dem Hepatomstückchen Schnitte mit der Dicke von 5μ hergestellt worden waren, wurden die Schnitte in NaCl-Lösung (s.o.) gewässert; ihre weitere Behandlung unterschied sich nicht von der für die Austestung spezifischer Antisera mit normalem Leber-

gewebe. Eine Kontrolle (Inkubation des Schnittes mit normalem Kaninchenserum) wurde durchgeführt.

B. Ergebnisse

Da sich keine immunologischen Unterschiede bei den Antiseren gegen Mitochondrien - K 1215, K 1216, K 1217 - und gegen die Mikrosomen - K 1121, K 1122, K 1124 - ergaben, werden die Ergebnisse bei der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung der Antiseren nicht gesondert besprochen.

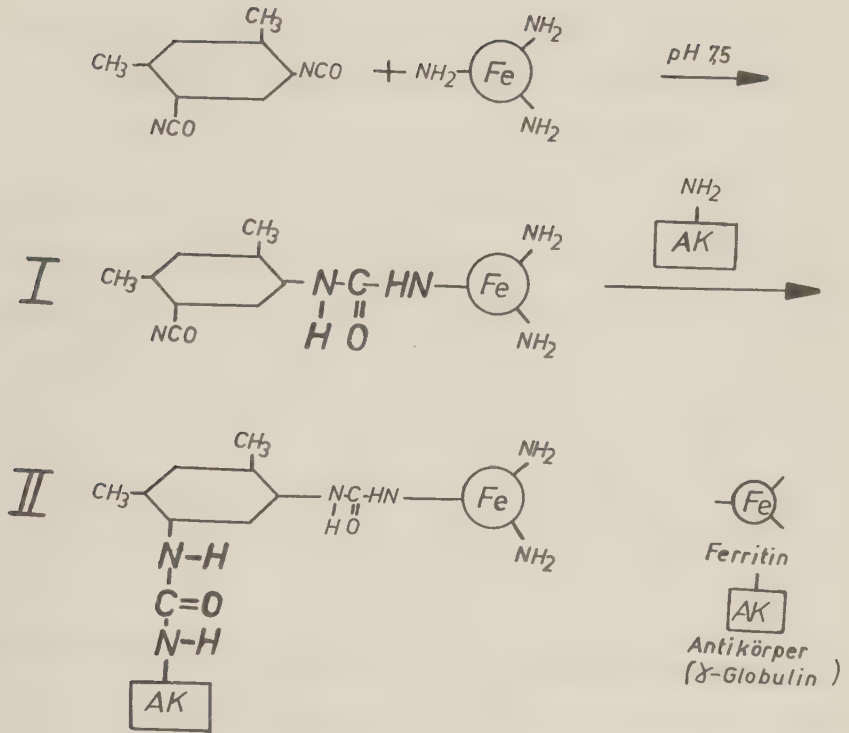
Als Zeichen einer gelungenen Sensibilisierung gegen die Mitochondrien und die Mikrosomen der Rattenleber fluoreszierte das Cytoplasma der Leberparenchymzellen bei der Austestung der Antiseren gleichmäßig. Nach vollständiger Absorption - Kontrolle III gab keine Kreuzreaktion mit den Schnitten der Rattenniere - der Antiseren zeigte sich eine intensivere Fluoreszenz des Cytoplasmas, in welches der Zellkern eingebettet ist, wobei die Zellperipherie schwächer leuchtete. (Abb. 1). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Antiseren gegen Mitochondrien und Mikrosomen ließ sich an der Fluoreszenz-Intensität und Lokalisation nicht erkennen. Hepatomgewebe zeigte keine markierende Fluoreszenz. Die im Hepatomschnitt erkennbaren fluoreszierenden Partien entsprachen noch carcinomfreiem Gewebe. Beim Vergleich mit den Kontrollschnitten waren diese ohne nennenswerte Fluoreszenz. Damit kann man nach Weiler aussagen, daß die Fluoreszenz des Lebergewebes auf einer spezifischen Ag-Ak-Reaktion beruht und unsere Antiseren spezifische Antikörper gegen Leberantigen enthalten; dieses ist offenbar in der

Mitochondrien-und Mikrosomenfraktion lokalisiert, was durch ferritinmarkierte Antikörper (γ -Globuline) weiter auszutesten galt.

II. Indirekte immunhistologische Austestung der Antiseren gegen leberspezifisches Antigen mittels ferritinmarkierter γ -Globuline (Antikörper)

A. Material und Methode

Das indirekte immunhistologische Verfahren ist in seiner Ausführung an die indirekte Fluoreszenzmethode nach Coons und Kaplan angelehnt. Im Unterschied zu ihr wird als markierende Substanz nicht Fluorescein-(iso)-thiocyanat, sondern Ferritin verwandt. Deshalb wird nach der Inkubation eine histochemische Eisenreaktion an den Schnitten durchgeführt. Sie macht das ferritingekoppelte Schaf- γ -Globulin, damit die abgelaufene Reaktion zwischen leberspezifischem Antigen und spezifischem Antikörper, im Lichtmikroskop sichtbar. Da das Problem der unspezifischen Reaktion bei Verwendung von ferritinmarkierten Schafglobulinen dem bei Gebrauch von fluoresceinmarkierten Antikörpern gleicht, ähneln die Kontrollen denen bei der indirekten Fluoreszenzmethode. Mit dem Blockingtest = Kontrolle I (Verwendung von unmarkierten Schafglobulinen vor Inkubation der an Ferritin gekoppelten) und Kontrolle II (Inkubation mit normalem Kaninchenserum) wird ausgeschlossen, daß ferritinunabhängiges Material (etwa Pigment) im Gewebe einen positiven Ausfall vortäuscht oder eine unspezifische Bindung der ferritingekoppelten γ -Globuline vorliegt.



Skizze 1: Schematische Darstellung der Kopplung von Ferritin an γ -Globulin über das Bindungsglied m-Xylylene-Diisocyanat.

1. Konjugation von γ -Globulinen vom Schaf mit Antikörpereigenschaft gegen Kaninchen- γ -Globuline an Ferritin nach Angaben von H s u (1)

a) Vorbemerkung: Ausgangsmaterial war eine 1 %ige Ferritinlösung. (Sie wird von der Firma A r n e l (USA) oder der Firma P e n t e x (USA) aus Pferdemilz gewonnen.) Nach G a r n i c k ist Ferritin ein Sphäroprotein, dessen Kern aus kristallinem Eisenoxydphosphat ($\text{Fe}(\text{OH})_3$) besteht. Um mit dem Ferritinmolekül arbeiten zu können, müssen wir die 1 %ige Ferritinlösung von Bruchstücken des Ferritinmoleküls und unspezifischen Eiweißen reinigen. Das gereinigte Ferritin lassen wir mit m-Xylylene-Diisocyanat (m-XDI) reagieren, da es zwei Valenzen für die Bindung von Aminogruppen besitzt. Bei genauem Vorgehen bleibt ein Cyanrest für die Kopplung eines Globulins über dessen Aminogruppe frei, wobei die Kopplung wie bei der Ferritin-m-XDI-Reaktion nur unter Umlagerung des - OCN-Restes zu - HN-CO-H-N- eintritt. (Skizze 1)

- b) Reinigung des Ferritins, Reaktion mit m-Xylylene-Diisocyanat und Kopplung des Ferritins an Schafglobuline:

Für die Ferritinreinigung und die Ferritinkopplung benötigten wir folgende Lösungen:

1. 2 %ige Ammoniumsulfat-Lösung $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; pH 5,83-5,85; der pH-Wert wurde täglich mit 0,1n NaOH oder 0,1n HCL eingestellt. Kühl aufbewahren.
2. 20 %ige Cadmiumsulfat-Lösung ($3 \text{ CdSO}_4 \cdot 8 \text{ H}_2\text{O}$). Wir gaben 25 g ad 100 ml Aqua dest. bzw. 50 g ad 200 ml unter Berücksichtigung des H_2O -Anteiles. Kühl aufbewahren.
3. Gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung, die heiß gelöst und bei

Zimmertemperatur aufbewahrt wurde,

4. Phosphatpuffer 0,05 m, pH 7,5. ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$)
5. 0,3 m Natriumboratpuffer bei pH 9,5, Borsäure 9,27 g ad 500 ml Aqua dest. pH 5,2, NaOH krist. 6 g ad 500 ml Aqua dest., 500 ml Borsäurelösung und ca. 350 ml NaOH ergibt pH 9,5,
6. 0,1 m Ammoniumkarbonatlösung
10 g Ammoniumkarbonatlösung ad 1 000 ml Aqua dest. unter Berücksichtigung des H_2O -Anteiles im Kristall.

Um den Reinigungs-und Kopplungsvorgang übersichtlich darzustellen, beschreiben wir die Arbeitsgänge jeden Tages.

1.Tag: In einen Meßzylinder mit ca. 85 ml einer 2 %igen Ammoniumsulfat-Lösung wurden 10 ml einer 1 %igen Ferritinlösung (1 Fläschchen) gegeben, das Fläschchen mit der Ammoniumsulfat-Lösung gut ausgespült, und damit der Meßzylinder bis 100 ml aufgefüllt. Der mit einem Handrefraktometer (H i t a c h i) gemessene Eiweißgehalt ergab:

80 mg/ ml (Firma Pentex)

100 mg/ ml (Firma Arnel)

Darauf schütteten wir 33,3 ml Cadmiumsulfat-Lösung zu den 100 ml, also den 4.Teil des Endvolumens. Der Lösungsansatz bestand aus 2 Fläschchen Ferritin. In einem 300 ml Kolben befanden sich demnach: 200 ml Ammoniumsulfat-Ferritin-Lösung und 68 ml Cadmiumsulfat-Lösung (5 %iger Cadmiumsulfatanteil). Nachdem wir den Kolben 1/2 Stunde bei Zimmertemperatur stehen gelassen hatten, betrachteten wir einen Tropfen der Lösung im Lichtmikroskop. Die "Kristalle" (= sternförmige Ferritinverklumpungen) waren noch ziem-

lich stumpfeckig und zwischen ihnen lagen Ferritinbruchstücke. (Wie wir später sehen werden, werden sie mit jeder Auskristallisierung spitzer. Auch die Bruchstücke verschwinden). Der Kolben blieb über Nacht im kalten Raum ($+ 4^{\circ}\text{C}$) stehen. Es wurden Zentrifugen und 60 ml Plastiktuben vorgekühlt ($+ 4^{\circ}\text{C}$).

2.Tag: Nach der Nacht war das "kristalline" Ferritin sedimentiert. Der klarere Überstand wurde zunächst in ein Zentrifugenröhrchen gebracht, dann das Sediment aufgeschüttelt, in 3 Röhrchen gegeben, und der Kolben mit dem Überstand gründlich ausgespült. Das Gemisch aus Sediment und Überstand wurde gleichmässig auf die Zentrifugenröhrchen verteilt; danach zentrifugierte die Suspension für 1 Stunde bei 2 500 U/min ($+ 4^{\circ}\text{C}$). Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen, die Ränder und die Seiten des Röhrchens gründlich trocken gewischt, bevor mit einem kleinen Teil einer abgemessenen 2 %igen Ammoniumsulfat-Lösung von 200 ml das Sediment gelöst und in einen 200 ml Kolben gegeben wurde. Mit der noch verbliebenen Ammoniumsulfat-Lösung wurden die Zentrifugenröhrchen wiederholt ausgespült und der Rest des Sedimentes und der Ammonium-Lösung in den 200 ml Kolben zugegeben. Bei dem nun folgenden Gang, Zentrifugation der 200 ml bei 2 500 U/min, blieb das Ferritin in Lösung, während die Bruchstücke sedimentierten. Wir fanden einen kleinen Bodensatz im Röhrchen. Der klar-braune Überstand wurde in einen 300 ml Kolben gegossen und 68 ml Cadmiumsulfat-Lösung zugesetzt. Wieder fällte das Cadmiumsulfat das Ferritin in der Nacht bei $+ 4^{\circ}\text{C}$ aus.

3.Tag: Im Mikroskop sahen wir gleichmäßig gelagerte "Kristalle" mit schärfer ausgebildeten Ecken. Wie am Vortage wurde der Überstand und das aufgewirbelte Sediment auf Zentrifugenröhrchen ver-

teilt, 1 Stunde bei 2 500 U/min zentrifugiert, das Sediment mit 200 ml 2 %iger Ammoniumsulfat-Lösung resuspendiert und 1 Stunde bei 2 500 U/min von Bruchstücken getrennt. Über Nacht (+ 4°C) sedimentierte das Ferritin erneut nach Zugabe von 68 ml Cadmiumsulfat.

4.Tag: Nach der 3. Fällung sind die "Kristalle" gleichmäßig gelagert, schwarzrandig und kantig-sternförmig, was nach Hsu eine genügende Reinigung anzeigt. Zuerst wurde 1 Stunde, 2 500 U/min, zentrifugiert, dann mit 120 ml 2 %iger Ammoniumsulfat-Lösung das Sediment nach und nach gelöst - immer wieder die Röhrchen spülen und in einem 300 ml Kolben gesammelt. 120 ml der gesättigten Ammoniumsulfat-Lösung wurde unter Schütteln zur Ferritinlösung hinzugegeben. Die nun 50 %ige Ammoniumsulfat-Ferritin-Lösung ließen wir über Nacht bei + 4°C stehen.

5.Tag: Nach einer Zentrifugation von 1 1/2 Stunde bei + 4°C mußte der Überstand farblos sein. (2 500 U/min). Wir lösten nun das Sediment in 120 ml Aqua dest. und gaben ausserdem 120 ml der Ammoniumsulfat-Lösung hinzu. Wieder blieb die Lösung über Nacht bei + 4°C stehen.

6.Tag: Wiederholung der Arbeit des Vortages.

7.Tag: Nach Zentrifugation von 1 Stunde 40 Min. wurde das Sediment in einer geringen Menge Aqua dest. gelöst (Zentrifugenröhrchen gut ausspülen) und zur Dialyse über Nacht unter fließendes Leitungswasser von 14 - 15°C in einen Dialyseschlauch eingefüllt. Da die Lösung gegenüber Leitungswasser hyperton war, wurde genügend Platz für eine 100 %ige Volumenvermehrung gelassen. Wir markierten am Dialyseschlauch die Höhe der Lösung nach dem Einfüllen und am nächsten Morgen.

Es ergab: Arnel 9 cm lang, morgens: 13,5 cm
 Pentex 7 cm lang, morgens: 8,5 cm

8.Tag: Die Dialyseschläuche brachten wir in 0,05 m Phosphatpuffer, um den Inhalt bei + 4°C mit Rührer 3 Stunden dialysieren zu lassen (8⁴⁵ - 11⁴⁵). Inzwischen wurden die Spinco-Zentrifuge, der Spinco-Rotationskopf und die Spinco-Röhrchen vorgekühlt. - Sobald das Dialysat für 45 Min. bei 2 500 U/min. zentrifugiert hatte, wiederholten wir mit dem Handrefraktometer eine Eiweißbestimmung:

Es ergab: 30 mg/ml (Pentex) - also einen EW-Verlust von
 50 mg/ml im Vergleich zur Eiweißbestimmung zu Beginn der Ferritinreinigung
 36 mg/ml (Arnel) - also einen EW-Verlust von
 64 mg/ml

Die Ausbeute der dialysierten, zentrifugierten Lösung betrug:

13 ml von Pentex = 390 mg Ferritin/30 mg/ml
22,5ml von Arnel = 852,5 mg Ferritin/36 mg/ml

Die Lösungen wurden in Spinco-Plastikröhrchen verteilt, mit frischem Phosphatpuffer pH 7,5 aufgefüllt und ohne Luft verschlossen. Danach wurde bei + 4°C und 50 000 U/min 3 Stunden zentrifugiert. Der Überstand wurde bis zum oberen Rand des Sedimentes abpipettiert, die Plastikröhrchen lose verschlossen und über Nacht in den Kühlschrank gestellt (+ 4°C). Für den nächsten Tag wurden Schliffstopfkölbchen mit je 2 Glasmagneten (die Glasmagneten waren in Glas eingelagert, Hsu's Selbstanfertigung) sterilisiert und Kapillaren (0,006 ml) mit m-Xylylene-Diisocyanat gefüllt. (Das Vorbereiten von gebrauchsfertigen Portionen von m-XDI vermeidet ein Auskristallisieren beim Öffnen und Schließen einer

Ampulle mit m-XDI. Eine 1 ml Ampulle wird geliefert von Polysciences Inc., Rydal/Pennsylvania). Mit einer 1 ml Pipette - lange Pipettenspitze und Gummiball benutzen, da m-XDI stark schleimhautreizend ist - wurden 0,4 ml m-Xylylene-Diisocyanat aufgesaugt; langsam ließen wir die Flüssigkeit in 1 trockene Kapillare überfließen, wobei 1 - 1,5 cm an beiden Enden ungefüllt bleiben sollten. Erst wurde das trockene, dann das feuchte Ende zugeschmolzen.

9.Tag: Die gelösten Arnel-Pentex-Lösungen wurden zusammen in ein Schliffstopfkölbchen pipettiert und deren Eiweißmenge gemessen.

Es ergab sich:

18 ml, 6,8 %ige Lösung = 1224 mg Ferritin oder

6 ml, 6,8 %ige Lösung = 408 mg Ferritin.

Je 6 ml der Ferritinlösung wurden in ein Glaskölbchen mit Glasmagneten (s.o.) zusammen mit 6 ml eines 0,05 m Phosphatpuffers pH 7,5 und 6 ml eines 0,3 m Boratpuffers pH 9,5 geschüttet; der Boratanteil in der Lösung war dann 0,1 m. Das Glaskölbchen stand in einem Eisbad. In je ein Kölbchen wurde der Inhalt von je drei Kapillaren eingetropft. Wir brachten die Ferritin-Xylylene-Lösung mit dem Eisbad schnell in ein kaltes Fach (+ 4°C), wo sie exakt 45 Min. gerührt wurde. Der Magnetrührer mußte so eingestellt werden, daß keine Schaumbildung auftrat. Nach den 45 Min. wurde die Ferritin-Xylylene-Lösung möglichst schnell zum Zentrifugieren in die Kälte gebracht (vorgekühlte Glasröhrchen, 30 Min., 2 500 U/min.) Die Reaktion ist ausserordentlich abhängig von der Zeit und dem kalten Milieu. Die Reagenzgläser standen in einem vorbereiteten Eiswasserbad, als wir rasch den Überstand des Zentrifugates mit Kapillarpipette und Gummiball in die Reagenzgläser

brachten. Zur Vervollständigung der Reaktion liessen wir die Reagenzgläser für 1 Stunde im Kühlschrank stehen und erneuerten ggf. das Eis. Der Restüberstand des letzten Zentrifugates wurde für die Immunelektrophorese und eine Eiweißbestimmung gesammelt. Der Eiweißgehalt kam auf 20 mg/ml. Somit enthalten 18 ml 360 mg EW.- Jetzt waren wir soweit, das mit m-XDI behandelte Ferritin an Schafglobuline zu koppeln. Wir pipettierten in ein in einem Eisbad stehendes Schliffstopfenkölbchen mit 2 Glasmagneten ein:

1. Schaf-Anti-Kaninchen 3 ml = 108 mg = 36 mg/ml
- γ -Globuline
2. Ferritin m-XDI 18 ml = 360 mg = 20 mg/ml

(Die Eiweißmengen/ml der Schafglobuline und des Ferritins m-XDI sollten möglichst im Verhältnis 1 : 1 stehen.)

3. 2 ml Boratpuffer (die Menge war von der Globulinlösung abhängig.)

Die Schafglobulin-Ferritinlösung rührte im Kältefach genau 48 Stunden.

10.Tag: Wir füllten einen Dialyseschlauch mit der Schafglobulin-Ferritin-Lösung und gaben ihn für 24 Stunden in eine 0,1 m Ammoniumcarbonat-Lösung (+ 4°C, Rührer, 2 x täglich den Puffer wechseln.)

11.Tag: Die Lösung wurde gegen Phosphatpuffer (0,05 m, pH 7,5) während 2 Stunden mit dem Rührer bei + 4°C umdialysiert. In der vorgekühlten Spinco-Ultrazentrifuge wurde das Dialysat für 5 Stunden bei 50 000 U/min zentrifugiert. Die Röhrchen waren, falls nötig, mit Phosphatpuffer ganz aufgefüllt worden. (I. Spinco-Zentrifugation). Nach der Zentrifugation wurde der klare Überstand bis zur

Höhe des Sedimentes abpipettiert, die Röhrchen lose verschlossen über Nacht in den Kühlschrank gestellt.

12.Tag: Das gelöste Sediment wurde im Glasröhrchen bei 2 500 U/min, + 4°C, für 1 Stunde zentrifugiert. Das Sediment enthielt ungekoppelte Schafglobuline. Wieder kam der Überstand in die Ultrazentrifuge (50 000 U/min, 5 Stunden). Danach wurde bis zur Höhe des Sedimentes der Phosphatpuffer abpipettiert und die Röhrchen lose verschlossen über Nacht in den Kühlschrank gestellt.

13.Tag: Die Arbeitsgänge der III. Ultrazentrifugation deckten sich mit denen des Vortages.

14.Tag: Wir zentrifugierten bei + 4°C in gläsernen Spitzenröhrchen für 1 Stunde bei 25 000 U/min. Der Überstand enthielt die Schaf-Anti-Kaninchen- γ -Globuline, die an Ferritin gekoppelt worden waren. Um aber sicher zu gehen, daß die Kopplungen zwischen Ferritin und Schaf-Anti-Kaninchen- γ -Globulinen eingetreten war, kontrollierten wir diese Lösung mit der Immunelektrophorese (Genaue Methodik s. H a f e r k a m p 1961). Dabei wurden in das Stanzloch 1 0,002 ml der mit Ferritin markierten Schafglobulin-Lösung und in das Stanzloch 2 die gleiche Menge der Ferritin-m-Xylylene-Diisocyanat-Lösung eingefüllt. Nach der elektrophoretischen Wanderung der Globuline gaben wir je 0,04 ml eines Antiserums gegen Schafglobuline in die Rinne A und eines Antiserums vom Hund gegen Ferritin in die Rinne B (Abb.2).

Das Ergebnis der immunelektrophoretischen Analyse zeigte, daß das Präzipitat des Ferritins mit dem des γ -Globulins kathodisch hinter dem 1. Stanzloch verschmilzt. Dies ist nach H s u (2) ein Zeichen für die gelungene Konjugation von Ferritin und γ -Globulin.

2. Durchführung der indirekten immunhistologischen Reaktion unter Verwendung der an Ferritin gekoppelten γ -Globuline (Anti-Antikörper).

Die an Nierengewebe absorbierten Antiseren gegen Mitochondrien und Mikrosomen der Rattenleber (Technik s. Teil I) wurden auf unfixierte Kryostatschnitte (5μ) von Rattenleber und Diäthylnitrosamin erzeugten Rattenhepatomen für 30 Min. gebracht. Nach gründlichem Spülen (15 Min., NaCl-Puffer, pH 7,2 (s. Teil I), 2 - 3 x die Spülflüssigkeit erneuern), wurden die Schnitte mit an Ferritin gekoppelten Schafglobulinen für 1/2 Stunde inkubiert und anschließend intensiv in NaCl-Puffer gewässert. Gleichzeitig wurden Schnitte für die Kontrolle I (Blockingtest) und die Kontrolle II angefertigt. Sie wurden wie die Versuchsschnitte behandelt.

3. Histochemische Eisenreaktion zum Nachweis der an Ferritin gekoppelten γ -Globuline im Gewebe nach der indirekten immunhistologischen Methode

a) Vorbemerkung: Bekanntlich kommt Eisen gebunden und ionisiert im Gewebe vor. Das Eisenion kann 2-fach (Ferro-oder Ferroxidylverbindung) oder 3-fach (Ferri-oder Eisenoxyd) positiv geladen sein. Die Wertigkeit bestimmt die histochemische Nachweismethode. Mit T u r n b u l l ' s Blau-Reaktion wird das gesamte ionisierte Eisen bestimmt. (H u e c k) Die B e r l i n e r - Blau - Reaktion prüft ausschließlich auf das Vorkommen von dreiwertigem Eisen. Da Ferritin eine Verbindung aus Eiweiß und dreiwertigem Eisen ist, bietet sich für den histochemischen Eisennachweis im Gewebe die Berliner-Blau-Reaktion an. Einen gewissermaßen Vorversuch für die

Verwendbarkeit der Berliner-Blau-Reaktion führten wir mit einem Ausstrich gereinigten Ferritins durch. Unter dem Lichtmikroskop sahen wir teils frei liegende, teils zusammengeballte blau-schwarze Körnchen von sternförmiger Gestalt mit scharfen Rändern. Ihre Form entsprach dem Bild der Ferritinmoleküle, welches wir während der Ferritinreinigung im Lichtmikroskop sahen (s.o.). Somit konnten wir hoffen, mit der Berliner-Blau-Reaktion auch die ferritinmarkierten Schafglobuline auf einem Gewebsschnitt zu erfassen.

b) Technische Durchführung: Nachdem die mit ferritingekoppelten Schafglobulinen überschichteten Leber- und Hepatomschnitte gründlich in NaCl-Lösung gespült worden waren, kamen sie für 30 Min. in eine frisch zubereitete Mischung aus 25 ccm einer 1 %igen Salzlösung, die 8 - 10 Tropfen einer frisch angesetzten 2 %igen Ferrocyankaliumlösung (gelbes Blutlaugensalz) enthielt. Es folgte ein sorgfältiges Spülen der Schnitte in Aqua dest.; dann wurde mit Kernechtrot gegengefärbt (15 Min.), in Eukitt eingedeckt und die Schnitte unter dem Lichtmikroskop betrachtet.

B. Ergebnisse

Wie bei der Auswertung der Methode von C o o n s und K a p l a n ergaben sich auch für das indirekte immunhistologische Verfahren mit ferritingekoppelten Antikörpern keine Unterschiede für die drei Antiseren gegen Lebermitochondrien- und Mikrosomen, sodaß die Ergebnisse zusammen besprochen werden können.

Nach Durchführung der Originalmethode, d.h. nach Inkubation des Gewebes mit einem der sechs Antiseren gegen Lebermitochondrien bzw. Lebermikrosomen und anschließender Einwirkung des an Ferritin gekoppelten Schaf-Anti-Kaninchen- γ -Globulins (Anti-Antikörper), zeigten sich in den Präparaten der normalen Rattenleber kleinste Körnchen, die den sternförmigen Ferritinpartikeln des Ausstriches glichen. Die Körnchen lagen im Cytoplasma bevorzugt um den Kern der durch Mikrotomschnitt eröffneten Parenchymzellen. Sie hatten einen kräftigen blauen Farbton, während das Lebergewebe rötlich gefärbt war. In keinem Fall konnte die Anwesenheit von blau gefärbten Ferritinpartikeln außerhalb der Parenchymzellen sichtbar gemacht werden. (Abb. 3 a) Durchmusterte man die Kontrollen, so waren diese frei von Ferritinkörnchen. Dasselbe galt für die Schnitte von Tumorgewebe, wo sich auch nicht bei der Originalmethode Ferritin hatte nachweisen lassen (Abb. 3 b)

Der Versuch, Ferritinpartikel ohne Eisenreaktion im Lichtmikroskop sichtbar zu machen, scheiterte, da die Zellorganellen - im Gegensatz zum Ausstrich - die Ferritinpartikel praktisch abdeckten und sie mangels einer farblichen Kontrastierung der Beobachtung entziehen.

Diskussion

Es gelang uns, Kaninchen-Antiseren gegen leberspezifische Antigene zu gewinnen und wie W e i l e r 1955 diese leberspezifischen Antigene und deren Verlust während der Cancerogenese durch Markierung des Antikörpers mit Fluoresceinisothiocyanat mit der in-

direkten Methode nach C o o n s und K a p l a n fluoreszenzmikroskopisch nachzuweisen.

Neu in dieser Arbeit war der Weg, nach Kopplung von Ferritin an Schaf- γ -Globuline (mit Antikörperaktivität gegen Kaninchen- γ -Globuline = Anti-Antikörper) mit einem indirekten, immunologischen, der Methode von Coons und Kaplan angelehnten Verfahren nach anschließender histochemischer Eisenreaktion im Lichtmikroskop annähernd die gleichen Ergebnisse vorzufinden, wie wir sie im Fluoreszenzmikroskop gesehen hatten. Wir fanden im Cytoplasma um den Kern kräftig blaue Körnchen gelagert, die wir bei den Kontrollen nicht sehen konnten. Eine Verwechslung der Körnchen mit in der Leberzelle vorkommenden eisenhaltigen Pigmenten (z.B. Hämosiderin) ist wegen der Form der Körnchen und dem negativen Resultat der Kontrollen auszuschließen. Sie gleichen den sogenannten Ferritinkristallen, wie sie H s u (1) nach Reinigung der Ferritinmoleküle gezeigt hat. Denn Ferritinmoleküle haben die Eigenschaft, sich zu sternförmigen Körpern zusammenzuballen, wodurch sie im Lichtmikroskop sichtbar gemacht werden können. Offenbar haben sie diese Eigenschaft auch nach Konjugation an die Antikörper nicht verloren, wenn sie - eben an Antikörper gebunden - sehr dicht im Gewebe liegen. Gegenüber dem Gebrauch von fluoresceingekoppelten Antikörpern hat die Verwendung von ferritinmarkierten Globulinen den Vorteil, daß die immunologische Reaktion noch nach Monaten auswertbar ist. Der Ferritin-Ag-Ak-Komplex bleibt stabil, zumal durch die Eisenreaktion die im Gewebe fixierte Eisenverbindung in eine anorganische, unlösliche Form überführt wurde.

Besonders wichtig scheint uns aber zu sein, daß dieses Verfahren die Bindung eines spezifischen, ferritinmarkierten Antikörpers an das spezifische Antigen einfach und schnell überprüft, d.h. die erhaltene Antikörperaktivität nach Kopplung nachweist. Somit kann zunächst ohne die komplizierte elektronenmikroskopische Technik ausgetestet werden, ob ferritingekoppelte, spezifische Antikörper noch für die submikroskopische Antigenlokalisation tauglich sind.

Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine einfache und schnelle Methode zu finden, die auch unter Umgehung der elektronenmikroskopischen Technik die Bindung ferritinmarkierter Antikörper an ein spezifisches Antigen nachweist; erst bei positivem Ausfall eines solchen, gewissermaßen Vorversuches würde dann die zeitraubende elektronenmikroskopische Technik lohnend erscheinen.

Als Modell dienten heterologe, spezifische Antiseren, wie sie W e i l e r 1955 zum Nachweis organspezifischer Antigene in Mitochondrien und Mikrosomen der Rattenleber anwandte. Mit solchen Antiseren konnte zunächst mittels der indirekten immunhistologischen Methode nach C o o n s und K a p l a n das Weiler'sche Ergebnis bestätigt werden. Anschließend wurden die immunhistologischen Arbeitsgänge wiederholt, nachdem das markierende γ -Globulin (Antikörper) statt an Fluoreszenzfarbstoff an Ferritin gekoppelt worden war; dabei wurden die Einzelheiten der Konjugation des Ferritins an die γ -Globuline ausführlich beschrieben. Die

Bindung dieser antikörperhaltigen γ -Globuline an das Gewebe konnte mit einer histochemischen Eisenreaktion nachgewiesen werden, indem sich dann in den Zellen der normalen Rattenleber sternförmige, blaue Körperchen fanden, die in den Hepatomschnitten bei Verwendung der gleichen Technik nicht zu sehen waren; wie aus Vergleichspräparationen mittels Ausstrichen von Ferritin auf Objektträgern hervorgeht, ist diese Form und Färbung (blaue, sternförmige Körnchen) in der Eisenreaktion lichtmikroskopisch kennzeichnend für Ferritinaggregate.

Mit ferritinmarkierten γ -Globulinen (Antikörpern) ist also das gleiche Resultat zu erzielen wie mit solchen, die an Fluoreszenzfarbstoff gebunden sind. Damit scheint dieses indirekte immunhistologische Verfahren eben mit Verwendung von ferritinmarkierten γ -Globulinen (Antikörpern) und anschließender histochemischen Eisenreaktion ein einfacher Test zu sein, um eine erhaltene Antikörperaktivität nach der Ferritinkopplung zu prüfen, ohne daß von vornherein eine elektronenoptische Betrachtung notwendig ist.

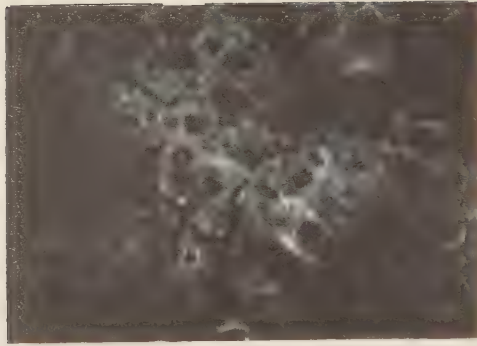


Abb. 1: Unfixierter Rattenleberschnitt nach Überschichtung mit einem an Nierengewebe absorbiertem Kaninchen-Antiserum(K1122) gegen die Mikrosomenfraktion einer normalen Rattenleber und anschließend Inkubation mit einem an Fluoresceinisothiocyanat gekoppelten Schaf- γ -Globulin mit Antikörper gegen Kaninchen - γ -Globulin.- Im Präparat gelb-grüne, in der Wiedergabe weißliche Fluoreszenz im Cytoplasma der Leberzellen. Die Fluoreszenz ist um die Kerne verstärkt. Vergr. 400x .

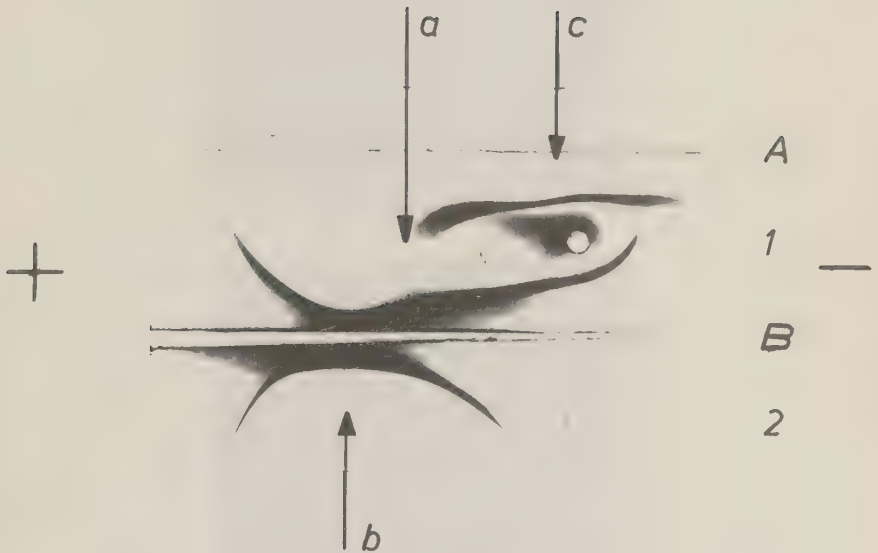
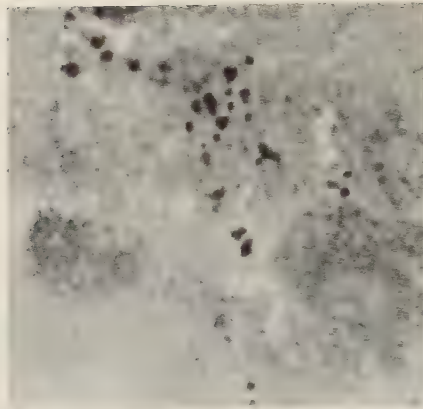
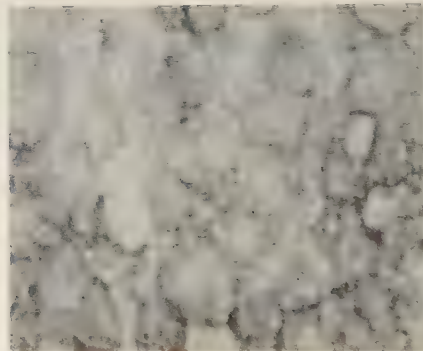


Abb. 2: Immunelektrophorese-Diagramm nach Ferritinmarkierung der Schaf- γ -Globuline. In Rinne A wurde ein Antiserum gegen Schaf- γ -Globuline, in Rinne B ein Antiserum gegen Ferritin einpipetiert. Stanzloch 1 enthielt ferritingekoppelte Schaf- γ -Globuline, Stanzloch 2 war mit Ferritin gefüllt worden. Verschmelzung des Ferritinpräzipitates mit dem des ferritinmarkierten Schaf- γ -Globulins (a); bei (b) alleiniges Ferritinpräzipitat; bei (c) ferritinmarkiertes Schaf- γ -Globulin nach Präzipitierung durch das Antiserum in Rinne A.



a



b

Abb. 3 a und b : Überschichten von unfixierten Gewebsschnitten mit einem an Nierengewebe absorbiertem Kaninchen-Antiserum(K1122) gegen die Mikrosomenfraktion einer normalen Rattenleber und anschließend Inkubation mit einem an Ferritin gekoppelten Schaf- γ -Globulin mit Antikörper gegen Kaninchen- γ -Globulin. a Rattenleber. Im Präparat kräftig blaue, in der Wiedergabe schwarze Körnchen im Cytoplasma der Leberzellen. Vergr. 600x . b Hepatom der Ratte. Im Präparat keine Körnchen im Cytoplasma der Zellen. Verg. 400x .

LITERATUR

Baldwin, R.W., C.R. Barker :

Antigen deletion in carcinogen induced rat hepatoma
Nature 214, No: 5065 (1967) 292

Coons, A.H., and M.H. Kaplan :

Localization of antigen in tissue cells.II. Improve-
ments in a method for the detection of antigen by
means of fluorescent antibody
J.exp.Med. 91, 1 - 13 (1950)

Day, E.D.:

The immunochemistry of cancer antigenic deletion
p 72-82 Springfield (III.) Ch.C.Thomas (1965)

Engelhardt, N.N., N.J. Khrankova and
Z.A. Postnikova :

Antigenic structure of mouse hepatomas IV. Study of
the liver organspecific antigen in the liver and he-
patomas with fluorescent antibodies
Neoplasma 10, 133-142 (1963)

Fischer, C. und E. Weiler :

Die histologische Darstellung des leberspezifischen
Antigens und dessen Schwund in Hepatomen mit Hilfe
des fluoreszenzmarkierten Antikomplementes
Z.Krebsforschung 64, 441-447 (1962)

Green, H.N., and T. Glose :

Localization of liverspecific antibodies in normal
and 3-DAB-treated rats, Nature 201, 308-309 (1964)

H a f e r k a m p, O.:

Ein tierexperimenteller Beitrag zur Immunpathologie
der Speicheldrüse

Virch.Arch.path.Anat.335,298-322 (1962)

H u g h e s, P.E.:

The significance of staining reaction of preneoplastic
rat liver with fluorescein globulin complexes

Cancer Res.18, 426 (1958)

H u g h e s, P.E., C.J. L o u i s, J.K. D i n e e n and

W.G. S p e c t o r s:

Role of organ-specific antigen during 4-Dimethyl-
aminoazobenzole carcinogenesis in the rat liver

Nature (Lond.) 180,289 (1967)

H s u, K.C.: (1) Persönliche Mitteilung

H s u, K.C.(2), R.A. R i f k i n d and J.A. Z a b r i s c h e s:

Fluorescent, electron microscope and immunoelectro-
phoretic studies of labelled antibodies

Science,142, No: 3598 (1963) 1471-1473

N a i r n, R.C., H.G. R i c h e m o n t, M.G. M c E n t e g a r t

and J.E. F o t h e r g i l l:

Immunological differences between normal and
malignant cells

Brit. Med. J.1335 (1960)

R i g g s, J.L., R.L. S e i w a l d, J.H. B u r c k h a l t e r,

C.M.D o w n s and T.G. M e t c a l f:

Isothiocyanat compounds as fluorescent labeling

agents for immune serum, Amer.J.Path.34, 1081-1097 (1958)

S c h m i d t, B., Y. H o s a k o v a and D. H a r t m a n n:
Elimination of non-specific antibodies from rabbit
antisera using acetone precipitated soluble proteins
Nature 211, 5044 (1966) 32

S c h m i d t, H.:
Fortschritte der Serologie
Steinkopff, Darmstadt (1955)

V o g e l, W., F. K a t z e n m e i e r und O. H a f e r k a m p:
Über die Anwendung der sogenannten Mixed Agglutination
zum immunhistologischen Antigennachweis in der Zelle
Virchows Arch.path.Anat.341, 245-254 (1966)

W e i l e r, E.:
Z.Naturforschung 7b, 324 (1952)

W e i l e r, E.:
Die Änderung der serologischen Spezifität der Ratte
während der Cancerogenese durch p-Dimethylaminoazobenzol
Z.Naturforschung 11b, 31-38 (1956)

H u e c k, W.:
Pigmentstudien
Beitr.path.Anat.54, (1913) 68

G r a n i c k, S.:
Ferritin; its properties and significance for iron
metabolism
Chem.Rev.38, 379 (1946)

An dieser Stelle möchte ich meinem verehrten Lehrer,
Herrn Professor Dr. O. H a f e r k a m p, für die stets ver-
ständnisvolle wissenschaftliche Anleitung danken. Ebenso
gilt mein Dank dem Leiter des Pathologischen Institutes,
Herrn Professor Dr. H. H a m p e r l, für die Übernahme des
Korreferates und Herrn Dr. H. E. S c h ä f e r (jetzt Patho-
logisches Institut Köln) für die wertvolle Hilfe bei dem
histochemischen Ferritinnachweis.

Lebenslauf

Am 31. Oktober 1943 wurde ich, Katharina Borowski, als zweites Kind des Bergassessors Fritz Hugo Borowski und dessen Ehefrau Brigitte Borowski, geb. Knobloch, in Beuthen/ Oberschlesien geboren. Mein Vater fiel als Kapitänleutnant d.R. im Juni 1944. Wir verließen Oberschlesien im Februar 1945 und lebten in Lichtenfels/Oberbayern, Konstanz und Baden-Baden. 1950 zogen wir nach Bonn. Hier wurde ich Ostern 1950 in die Friedrich-Soennecken Schule eingeschult, wechselte Ostern 1954 auf die Clara-Schumann Schule über, an der ich im März 1963 mein Abitur ablegte. Seit Mai 1963 studiere ich an der Bonner Universität Medizin. Meine naturwissenschaftliche Vorprüfung legte ich im März 1964 ab; ihr folgte im August 1965 die ärztliche Vorprüfung. Im Winter-Semester 1968 werde ich mich für das Staatsexamen melden.

